

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



CH PATENTSCHRIFT

V

- (21) Gesuchsnummer: 6290/71
(61) Zusatz zu:
(62) Teilgesuch von:
(22) Anmeldungsdatum: 29. 4. 1971, 17 h
(33) (32) (31) Priorität:

- Patent erteilt: 15. 6. 1974
(45) Patentschrift veröffentlicht: 31. 7. 1974

- (54) Titel: **Verfahren und Vorrichtung zur Anzucht lyophilisierter anaerober Bakterien auf sterilen Nährmedien zu aktiven Kulturen**

- (73) Inhaber: Otto Bieri, Bern

- (74) Vertreter:

- (72) Erfinder: Otto Bieri, Bern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anzüchtung bakteriologisch reiner Kulturen mit Hilfe einer Vorrichtung, die aus einem an beiden Enden verschweissten Stück Schlauch besteht, und ein flüssiges steriles Nährmedium sowie lyophilisierte Bakterienstämme in Ampullen enthält.

Die bisher bekannten und gebräuchlichen Anzüchtungsverfahren setzen minimale Laboreinrichtungen, insbesondere das Vorhandensein von Brenner und sterilen Geräten voraus. Um die in Ampullen gespeicherten Bakterien bei ihrer Übertragung auf die sterilen Nährsubstrate vor einer Infektion zu bewahren, muss die Bruchstelle der Ampulle abflambiert werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass Industrie- und Gewerbebetriebe, insbesondere Käsereien und Molkereien mangels entsprechender Laboreinrichtungen kaum in der Lage sind, unter Ausschluss von Fremdinfectionen bakteriologisch reine Kulturen anzuzüchten. Aus diesem Grunde sind die erwähnten Betriebe bei der Beimpfung ihrer Betriebskulturen auf bereits angezüchtete einsatzbereite Starterkulturen angewiesen.

Die Erfindung bezweckt, jederzeit und überall jede Fremdinfection bei der Anzucht auszuschliessen und bakteriologisch reine Kulturen zu gewährleisten. Diese Aufgabe wird mit Hilfe der nachstehend zu beschreibenden Vorrichtung erfindungsgemäss dadurch erreicht, dass die im verschweissten Schlauch ausser dem Nährmedium noch enthaltene Ampulle mit den lyophilisierten Bakterien ohne Öffnen des Schlauches gebrochen wird, was zur Anzüchtung der Bakterien auf dem Nährsubstrat zu einer aktiven Kultur führt, deren Aktivität und Bakterienbesatz sich dadurch steigern lässt, dass bereits die erste Anzüchtung in einer mit Hilfe eines Quetschhahns 6a unterbundenen 7 Zelle des Schlauchstückes vorzunehmen ist, in deren Anschluss nach erfolgtem Bakterienwachstum mit Hilfe eines zweiten Quetschhahns 6b eine wird, dass unterhalb des ersten Quetschhahns 6a in der oberen Hälfte der ersten Zelle 7a mittels eines dritten Quetschhahns 6c eine bestimmte Menge Kultur 8 abgebunden und durch Entfernen des zuerst angebrachten Quetschhahns 6a auf dem Nährmedium der zweiten Zelle 7b an- und weitergezüchtet wird. Dieser Vorgang ist nach Bedarf und Belieben zu wiederholen.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung besteht aus einem in seiner Länge und seinem Durchmesser den jeweiligen Bedürfnissen anzupassenden Stück transparentem Schlauch 3, vorzugsweise aus Kunststoff, mit verschweissten Enden 4. Der Schlauch enthält ein steril abgepacktes, individuell wählbares, flüssiges Nährmedium 1 und eine oder mehrere äusserlich keimfreie Ampullen 2, die mit einzelnen lyophilisierten Bakterienstämmen oder mit einem Gemisch von Bakterienstämmen angefüllt sind. Die Ampulle weist eine angesägte, leicht brechbare Stelle auf. Der transparente Schlauch kann graduert 5 und zum Beispiel mit XYI, XYII, XYTV 5a beschriftet werden. Anhand der bildlichen Darstellung eines Ausführungsbeispiels werden die erfindungsgemässe Vorrichtung und das erfindungsgemässe Anzüchtungsverfahren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf die Vorrichtung;

Fig. 2 eine Draufsicht auf die Vorrichtung mit abgeschweisster Zelle 9 zu Kontrollzwecken. Bakteriologische Kontrolluntersuchungen des Nährmediums oder der gezüchteten Kultur können jederzeit vorgenommen werden, indem ein

Teil des Schlauches mit dem entsprechenden Inhalt abgeschweisst wird;

Fig. 3 Seitenansicht der Vorrichtung, die mit Hilfe von Quetschhahnen 6 in Zellen 7 aufgeteilt wurde;

Fig. 4 Draufsicht auf die Vorrichtung nach Fig. 3 mit Darstellung des Weiterzüchtens der gewachsenen Kultur 1a von Zelle 7a zu Zelle 7b. Mit Hilfe von aufklappbaren Quetschhahnen 6 nach Hofmann oder mit Hilfe ähnlicher Instrumente lassen sich absolut dichte Zellen 7 abquetschen. Fig. 3 und 4 zeigen, dass sich der Vorgang des Weiterzüchtens von Zelle zu Zelle dem Bedarf entsprechend beliebig oft wiederholen lässt. Beim Weiterzüchten ist stets darauf zu achten, dass jede Zelle nur zirka zur Hälfte ihres Volumens mit Nährsubstrat gefüllt wird, damit genügend Raum für die Quetschhahnen freibleibt. Auch das erfindungsgemässe Verfahren des Weiterzüchtens kann unter hermetischem Verschluss der erfindungsgemässen Vorrichtung und somit unter Ausschluss jeglicher Infektionsgefahr durchgeführt werden. Es ermöglicht ohne weiteres das Erzielen einer Starterkultur mit genügend hoher Keimzahl und Aktivität.

PATENTANSPRÜCHE

I. Verfahren zur Anzüchtung und Weiterzüchtung von in Ampullen gespeicherten lyophilisierten anaeroben Bakterien auf sterilen Nährmedien in verschweisstem Schlauch zu aktiven Kulturen, dadurch gekennzeichnet, dass die Ampulle ohne Öffnen des Schlauches gebrochen wird, was zur Anzüchtung der Bakterien auf dem Nährsubstrat zu einer aktiven Kultur führt, deren Aktivität und Bakterienbesatz sich dadurch steigern lässt, dass bereits die erste Anzüchtung in einer mit Hilfe eines Quetschhahns unterbundenen Schlauchzelle vorzunehmen ist, in deren Anschluss nach erfolgtem Bakterienwachstum mit Hilfe eines weiteren Quetschhahns eine zweite Zelle abzutrennen ist, deren Beimpfung dadurch erzielt wird, dass unterhalb des ersten Quetschhahns in der oberen Hälfte der ersten Zelle mittels eines dritten Quetschhahns eine bestimmte Menge Kultur abgebunden und durch Entfernen des zuerst angebrachten Quetschhahns auf dem Nährmedium der zweiten Zelle an- und weitergezüchtet wird, welcher Vorgang sich nach Bedarf und Belieben wiederholen lässt.

II. Vorrichtung zur Anzüchtung und Weiterzüchtung von biologisch reinen Bakterienkulturen, dadurch gekennzeichnet, dass in ein an beiden Enden verschweisstes, beliebig langes transparentes Stück Schlauch ein steril abgepacktes individuell wählbares, flüssiges Nährmedium und eine oder mehrere äusserlich keimfreie Ampullen enthält, die mit einzelnen Bakterienstämmen oder mit einem Gemisch von Bakterienstämmen angefüllt sind und eine angesägte leicht brechbare Stelle aufweisen.

UNTERANSPRÜCHE

1. Vorrichtung nach Patentanspruch II, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit Hilfe von Quetschhahnen in Zellen unterteilt ist.

2. Vorrichtung nach Patentanspruch II und Unteranspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Schlauchstück und die einzelnen Zellen beschriftet und graduert werden können.

Fig. 1

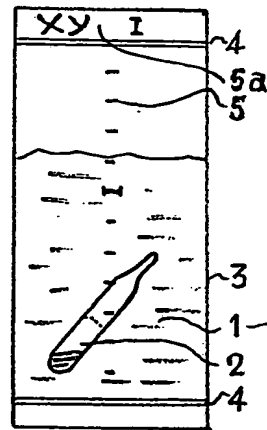


Fig. 3

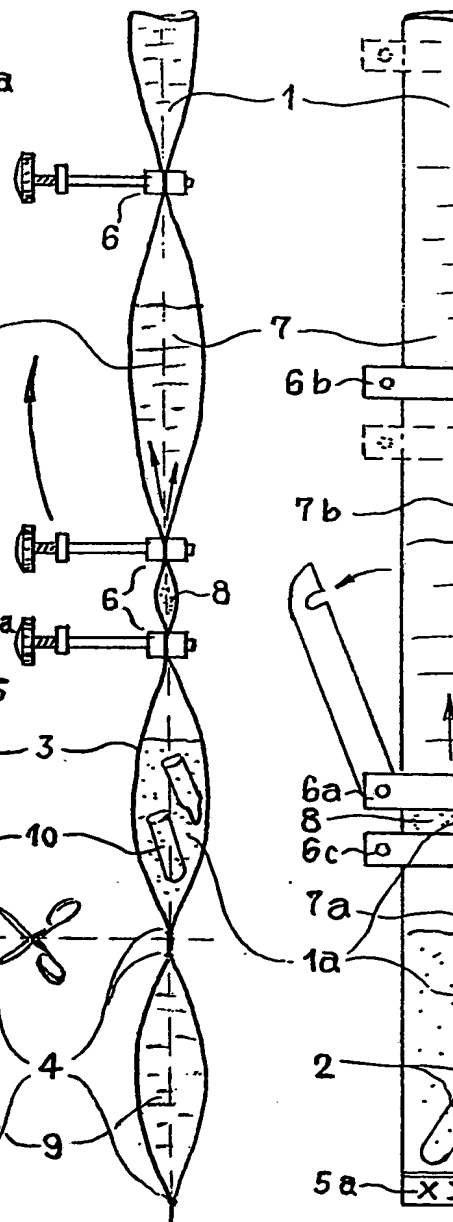


Fig. 2

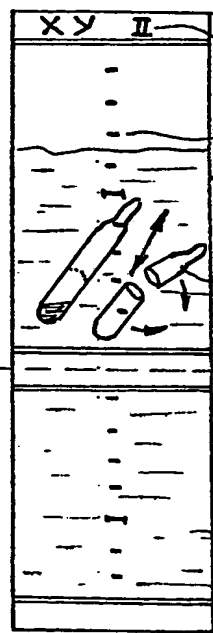
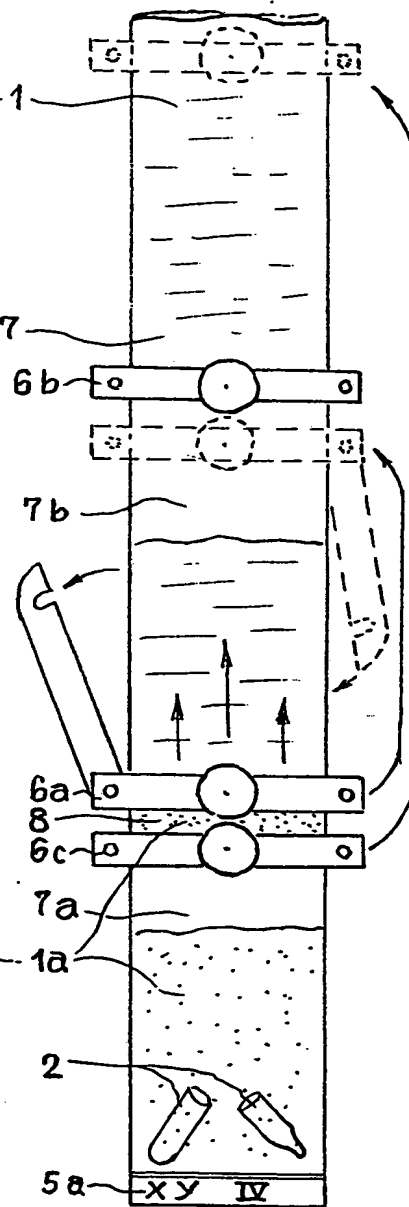


Fig. 4



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

SWISS CONFEDERATION
CONFEDERATE OFFICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY

SWISS PATENT SPECIFICATION 552 063

Application number: 6290/71

Date of Application: 29.4.1971, 5 pm

Patent granted on: 15.6.1974

Patent specification published on: 31.7.1974

**Title: Method and device for cultivating lyophilized
anaerobic bacteria to active cultures on sterile
culture media**

Holder: Otto Bieri, Bern

Inventor: Otto Bieri, Bern

The invention relates to a method for cultivating bacteriologically pure cultures with the aid of a device which consists of a piece of tubing sealed at both ends and which contains a sterile liquid culture medium and lyophilized bacterial strains in ampoules.

The cultivation methods known and used to date require minimal laboratory equipment, in particular the presence of a burner and sterile tools. In order to protect the bacteria stored in ampoules from an infection during their transfer to the sterile nutrient substrates, the ampoule's break has to be flamed. The disadvantage of this method is that industrial and commercial enterprises, in particular cheese factories and dairies, due to a lack of appropriate laboratory equipment, are hardly able to cultivate bacteriologically pure cultures without infections with foreign organisms. For this reason, the mentioned enterprises rely on already cultivated, ready-to-use starter cultures for inoculation of their working cultures.

It is the object of the invention to exclude, at any time and anywhere, any infection with foreign organisms during cultivation and to guarantee bacteriologically pure cultures. This object is achieved according to the invention with the aid of the device to be described hereinbelow by breaking the ampoule with the lyophilized bacteria, which is contained in the sealed tube in addition to the culture medium, without opening the tube, leading to cultivation of the bacteria on the nutrient substrate to an active culture whose activity and bacteria content can be increased by having to carry out already the first cultivation in a compartment 7 of the piece of tubing, which has been tied off with the aid of a pinch cock 6a, which first cultivation, after the bacteria have grown, is followed by [having to separate off a second compartment] with the aid of a second pinch cock 6b, [which second

compartment is inoculated] by tying off a particular amount of culture 8 by means of a third pinch cock 6c in the upper half of the first compartment 7a below the first pinch cock 6a and by cultivating and continuing
5 culturing on the culture medium of the second compartment 7b by removing the initially applied pinch cock 6a. This procedure can be repeated as required and desired.

10 The device of the invention consists of a piece of transparent tubing 3 whose length and diameter are to be adjusted to the particular needs and which is preferably made of plastic and has sealed ends 4. The tube contains an individually selectable liquid culture
15 medium 1, packed in a sterile manner, and one or more ampoules 2 which are germ-free on the outside and filled with individual lyophilized bacterial strains or with a mixture of bacterial strains. The ampoule has an incised, readily breakable site. The transparent tube
20 can be graduated 5 and labelled, for example with XYI, XYII, XYIV, 5a. The device of the invention and the cultivation method of the invention are illustrated in more detail on the basis of the visual representation of an exemplary embodiment. The figures show:

25 in Fig. 1 a top view of the device;

in Fig. 2 a top view of the device with sealed-off compartment 9 as a control. It is possible at any time
30 to carry out bacteriological control tests of the culture medium or the cultured culture by sealing off a part of the tube, which has the appropriate contents;

in Fig. 3 a side view of the device which was divided
35 into compartments 7 with the aid of pinch cocks 6;

in Fig. 4 a top view of the device of Fig. 3, which depicts the continued culturing of the grown culture 1a from compartment 7a to compartment 7b. Absolutely tight

compartments 7 can be squeezed off with the aid of folding pinch cocks 6 according to Hofmann or with the aid of similar tools. Figs. 3 and 4 show that it is possible to repeat the process of continued culturing from compartment to compartment as often as desired, according to need. When continuing culturing, care must always be taken to fill only approximately half the volume of each compartment with nutrient substrate so as to leave enough free space for the pinch cocks. The inventive method of continued culturing, too, can be carried out with the hermetically sealed-off device of the invention and thus without any danger of infection. It makes achieving a starter culture with a sufficiently high number of germs and activity readily possible.

PATENT CLAIMS

- I. Method for cultivation and continued culturing of
ampoule-stored, lyophilized, anaerobic bacteria to
5 active cultures on sterile culture media in a
sealed tube, characterized in that the ampoule is
broken without opening the tube, leading to
cultivation of the bacteria on the nutrient
substrate to an active culture whose activity and
10 bacteria content can be increased by having to
carry out already the first cultivation in a tube
compartment, which has been tied off with the aid
of a pinch cock, which first cultivation, after the
bacteria have grown, is followed by having to
15 separate off a second compartment with the aid of
another pinch cock, which compartment is inoculated
by tying off a particular amount of culture by
means of a third pinch cock in the upper half of
the first compartment below the first pinch cock
20 and by cultivating and continuing culturing the
said particular amount of culture on the culture
medium of the second compartment by removing the
initially applied pinch cock; this procedure can be
repeated as required and desired.
- 25
- II. Device for cultivation and continued culturing of
biologically pure bacterial strains, characterized
in that a transparent piece of tubing of any
length and sealed at both ends contains an
30 individually selectable liquid culture medium
packed in a sterile manner and one or more
ampoules which are germ-free on the outside and
are filled with individual lyophilized bacterial
strains or with a mixture of bacterial strains and
35 have an incised, readily breakable site.

SUBCLAIMS

1. Device according to Patent Claim II, characterized

in that it is divided into compartments with the aid of pinch cocks.

2. Device according to Patent Claim II and Subclaim 1, characterized in that the piece of tubing and the individual compartments can be labelled and graduated.

Fig. 1

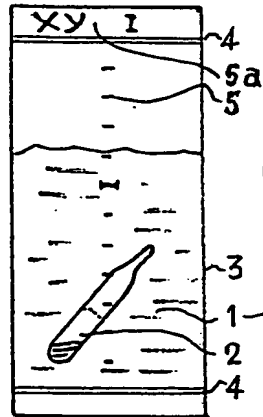


Fig. 3

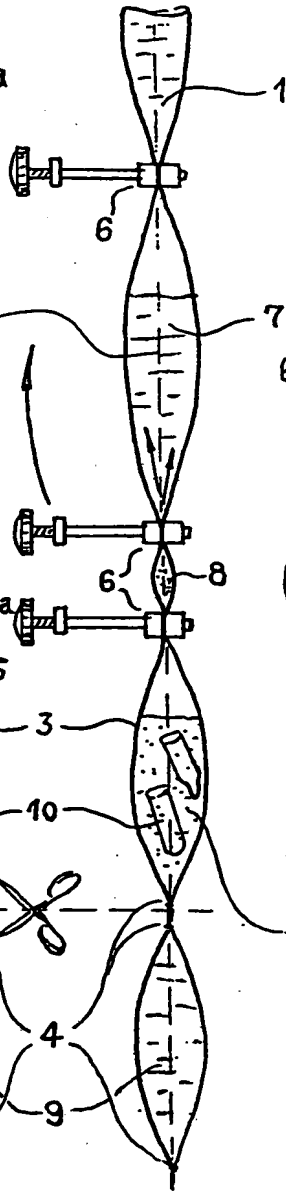


Fig. 4

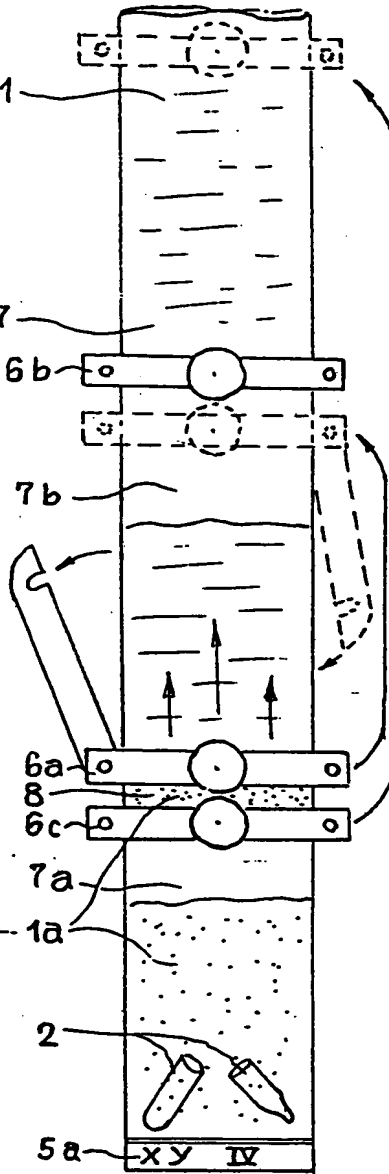


Fig. 2

